动 物 学 研 究 1997. 18 (2): 213—219 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

林氏果蝇种群间 mtDNA 的比较研究*

谢 力 温硕洋 谢以权 彭统序
(广东省昆虫研究所 广州 510260)

摘要 运用 10 种限制性内切酶分析了林氏果蝇（*Drosophila lini*）来自不同地区的 22 个单雌系的线粒体 DNA（mtDNA）限制性片段长度多态性（RFLP）。采自台湾省的 TAW3146.1 与大多数采自广东的品系相同；而广东省品系中则存在一定程度的分化，DHS 307、315 和 NKS 9234 仅在 *Hin*d Ⅲ的酶切位点上与其余单雌系不同；TAW 3146.1 与来自缅甸中部的 MMY 307，MMY 326 之间的遗传距离为 0.00274；MMY 307 与 MMY 326 之间无差异；TAW 3146.1 与来自缅甸南部的 RGN 3，RGN 206 的遗传距离分别为 0.00534 和 0.00553；MMY 307，MMY 326 与 RGN 3，RGN 206 则分别为 0.00835 和 0.00868。RGN 3、206 的分化较为明显。这一结果与生殖隔离测试的结果基本一致。

关键词 林氏果蝇，线粒体 DNA(mtDNA)，多态性，遗传分化 种群

随着分子生物学的发展，在分子水平上研究物种的进化已成为近年来进化遗传学研究的一个重要方面。1962 年 Nass 发现了线粒体之后，许多学者研究了动物线粒体 DNA(mtDNA)的结构及功能，认为它是研究进化遗传的合适材料。因为 mtDNA 是共价闭合的环状双链 DNA，具有分子结构简单，容易提纯；进化速度快；母系遗传；且在遗传过程中不发生重组等特点，利用限制性内切酶处理 mtDNA，得到的限制性片段长度多态（restriction fragment length polymorphism, RFLP）或限制性内切酶酶切位点图谱可以有效地建立种内不同种群以及近缘种之间的进化关系。

果蝇是现代生物学研究的重要实验材料，果蝇的分子生物学、分子遗传学以及进化遗传学的研究，是目前极为活跃的领域。在果蝇科 mtDNA 的研究中，*Drosophila melanogaster*、*D. albomicans*、*D. virilis*、*D. obscura* 等种组的研究最为广泛和深入。Clary 等（1985）报道了 *D. yakuba* mtDNA 的核苷酸序列；Solignac 等（1986）对 *D. melanogster* 种亚组的 8 个种的 mtDNA 建立了限制性内切酶酶切位点图，在此基础上建立了系统进化树；Latorre 等（1986，1988）研究了 *D. obscura*. *D. subobscura* 种组的 mtDNA 进化；张慧羽等（1988，1989a，1989b）和 Tamura（1991）报道了 *D. albomicans* 和 *D. nasuta* 的 mtDNA 多态性和进化，王文等（1993，1994）研究了 *D. albomicans* 自然群体中的 mtDNA 多态性和其起源及进化，陈伟京等（1994）报道了 *D. albomicans* 迁入上海的事实及对 mtDNA 多态性进行了研究；贾振宇等（1995）研究了 *D. virilis* 若干群体的 mtDNA 多态性。与动物的其它类群相比，果蝇 mtDNA 的研究起步较早，但由于果蝇有 3000 多种，类群繁多，分布全球，从分子水平上研究其进化，探

---

* 国家自然科学基金资助项目
本文 1996 年 1 月 19 日收到，同年 7 月 16 日修回

明物种起源的途径与扩散的路线，仍需要许多资料的积累。

林氏果蝇（*Drosophila lini* Bock & Wheeler，1972）原产于我国台湾省，属 *D. melanogaster* 种组（species group）*D. montium* 种亚组（species subgroup），分布于中国的台湾、广东、云南及缅甸等地。该种亚组全世界有 80 余种，主要分布在东南亚地区和热带非洲，由于一些种类用外部形态甚至外生殖器难以区分，加上物种分化速度较快，是近年来研究果蝇进化的热点类群之一（Baimai 等，1980，1986；Kim 等，1988，1989，1993；Ohnishi 等，1984）。

通过生殖隔离测试和交配行为研究，我们发现某些种群与台湾种群有明显的生殖隔离（Oguma 等，1995）。为了更进一步从分子水平上了解林氏果蝇种内的分化情况，本文对林氏果蝇若干地理种群的 mtDNA 作了初步分析比较。

1 材料和方法

1.1 材料 见表 1。

表 1 实验材料

Tab.1 Collection localities of isofemale lines of *D. lini* used in this study

采集地	单雌系数目	编号
中国台湾省	1	TAW 3146.1
中国广东省鼎湖山	14	DHS*
中国广东省南昆山	3	NKS 9212, 9231, 9243
缅甸中部 Maymyo	2	MMY 307, MMY 326
缅甸南部 Rangoon	2	RGN 3, RGN 206

*DHS 共有 14 个单雌系,分别为 207、211、215、216、217、221、305、307、311、315、400、401、410、501。

1.2 试剂

10 种限制性内切酶分别为购自 Boehringer Mannheim 公司的 *Bcl* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Sca* Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Xba* Ⅰ和 Life Technoligies 公司的 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Hin*d Ⅲ、Pst Ⅰ、SDS 为 Serva 公司进口分装；琼脂糖为北京中山生物技术有限公司产品(9201)；其他试剂为国产分析纯。

1.3 线粒体 DNA 的提取和纯化

参照 Tamura（1988）的方法并加以改进。取 1 g 活成蝇（三天龄以后），用 15 ml 预冷匀浆缓冲液（0.25 mol／L）蔗糖、10 mmol／L EDTA、30 mmol／L Tris-HCl, pH 7.5）在研钵中研磨（冰浴中），然后用纱布过滤，用 5 ml 预冷的匀浆缓冲液洗纱布及滤渣，将滤液装入预冷的 50 ml 电动匀浆器（2000 r／min）中，上下匀浆 5 次，使大多数细胞被破碎。将匀浆液分装于两支离心管中，加缓冲液至每管 30 ml，高速离心（1000*g*，4℃）10 min，以沉淀细胞核及细胞碎片，取上清液高速离心（12000*g*、4℃）20 min 沉淀线粒体，弃上清液并加 1 ml STE 缓冲液（10 mmol／L Tris-EDTA 缓冲液，pH8.0，含 0.15 mol／L NaCl，10 mmol／L EDTA）混匀后移入 1.5 ml 离心管中，高速离心（12000*g*、4℃）5 min，弃上清液，加入 TE 缓冲液至 100 μl 总体积。加入 200 μl 含 NaCl 的 1% SDS 溶液（1 份 10% SDS 加 9 份 2 mol／L NaOH，新鲜配制），在小型电动混合器上混匀，冰浴 5 min，再加入 150 μl 预冷醋酸钾溶液（3 mol／L Potasssium、5 mol／L Acetate）在混合器上混匀，冰浴 5 min，然后高速离心(12000*g*、

4℃）5 min，取上清液、加等体积的酚-氯仿溶液〔1 份饱和酚、1 份氯仿：异丙醇（24：1)〕，混合器上充分混匀，高速离心（12000*g*、4℃）5 min。将水相移至 1.5 ml 离心管，加 0.8 倍体积的异丙醇，混合器上混匀，在室温下保存 1 h 后高速离心（12000*g*、室温）10 min，沉淀为 mtDNA。加 1 ml 70%乙醇清洗 mtDNA，高速离心（12000*g*、室温）5 min，真空干燥 mtDNA 约 2 min，每管加 50 μl TE+RNase 缓冲液（10 mmol／L Tris-HCl、pH8.0，含 1 mmol／L EDTA 及 20 μg／ml RNase），贮存于-20℃下待用。

1.4　限制性内切酶酶解

用 *Bam*H Ⅰ, *Bcl* Ⅰ, *Eco*R Ⅰ, *Eco*R Ⅴ, *Hin*d Ⅲ, *Pst* Ⅰ, *Pvu* Ⅱ, *Sac* Ⅰ, *Sca* Ⅰ, 和 *Xba* Ⅰ共 10 种限制性内切酶酶解果蝇的 mtDNA。酶解反应按厂商推荐的条件进行。

1.5　琼脂糖凝胶电泳

酶解样品用 0.7%琼脂糖凝胶电泳分离，电泳缓冲液为 TPE 系统（0.08 mol／L Tris-磷酸，2 mmol／L EDTA，10 mmol／L NaCl)。电压 5 V／cm，时间 2.5 h。电泳后将凝胶置于溴化乙锭染色液（1 μg／ml）中染色 30 min，在紫外光下观察并拍照。

1.6　数据处理和分析方法

以 λDNA／*Hin*d Ⅲ或 λDNA／*Sty* Ⅰ作为分子量标记，确定样品 mtDNA 酶解后每一片段的分子量。运用片段法（Nei 等，1979)，算出限制性类型的片段共享度 *F* 和类型之间的遗传距离 *P*。

$$P \approx 1-\{[-F+(F^2+8F)^{1/2}]/2\}^{1/6}$$

$$F = 2n_{xy}/(n_x+n_y)$$

式中 *P* 为每一位点的平均碱基置换度，代表物种间的遗传距离，*F* 为物种间的限制性片段共享度，n_x 和 n_y 分别为物种（种群）X 和 Y 的限制性片段数，n_{xy} 为两物种（种群）间相同的片段数。

2　结果

在所使用的 10 种限制性内切酶中，林氏果蝇的 mtDNA 在 *Bcl* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Hin*d Ⅲ、*Sac* Ⅰ和 *Sca* Ⅰ等酶切类型上出现了多态型，在 *Eco*R Ⅴ、*Pvu* Ⅱ和 *Xba* Ⅰ的酶切类型上则无差异，而 *Bam*H Ⅰ和 *Pst* Ⅰ在林氏果蝇 mtDNA 上无识别位点（见表 2)。为简洁起见，文中仅给出 *Eco*R Ⅰ的酶切电泳图谱（图 1)。

表 2　10 种限制性内切酶酶切类型和酶切片段大小
Tab.2　Nucleomorphs and restriction fragments

酶	酶切类型	限制性片段大小(kb)
*Bam*H Ⅰ	－	无切点
Bcl Ⅰ	A	8.07, 3.51, 1.70, 1.43, 1.27, 0.32
	B	8.07, 2.53, 1.70, 1.43, 1.27, 0.98, 0.32
*Eco*R Ⅰ	A	8.28, 4.24, 1.76, 1.10, 0.92
	B	8.28, 6.00, 1.10, 0.92
*Eco*R Ⅴ	A	16.3
*Hin*d Ⅲ	A	5.64, 4.89, 2.78, 1.57, 1.42
	B	7.06, 4.89, 2.78, 1.57
Pst Ⅰ	－	无切点
Pvu Ⅱ	A	10.81, 2.10, 1.97, 0.83, 0.59
Sac Ⅰ	A	6.43, 4.03, 3.48, 2.36
	B	6.43, 5.84, 4.03
Sca Ⅰ	A	8.63, 5.03, 2.64
	B	7.16, 5.03, 2.64, 1.47
Xba Ⅰ	A	9.23, 6.09, 0.98



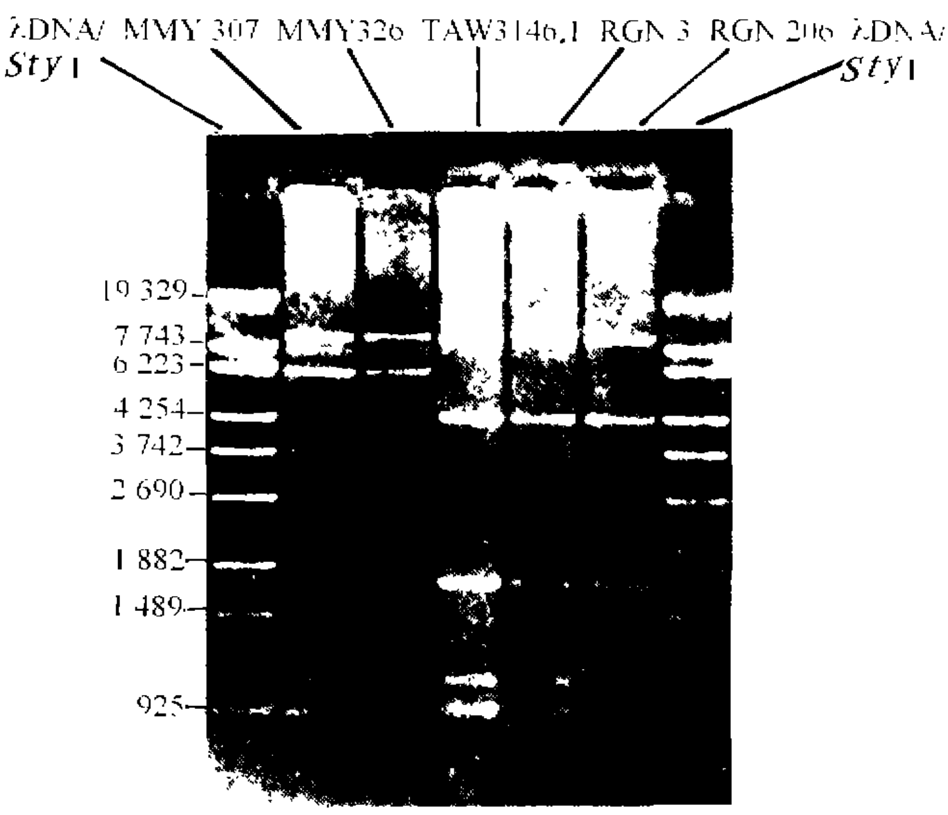


图 1 林氏果蝇 mtDNA *Eco*R Ⅰ酶切图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of *Drosophila lini* mtDNA digested with *Eco*R Ⅰ

各单雌系的 mtDNA 限制性类型见表 3。作用于 TAW3146.1 的每一种酶的酶切类型以"A"表示，发生变异的酶切类型以"B"表示。可以看到，*Hin*dⅢ酶切类型的变异仅出现在广东省种群（DHS 和 NKS）中，*Hin*d Ⅲ-A 比 *Hin*dⅢ-B 在 7.06 片段上多了一个切点；*Eco*R Ⅰ-B 酶切类型是缅甸种群 MMY 307 和 MMY 326 所独有，缺少了 *Eco*R Ⅰ-A 酶切类型中 4.24 与 1.76 之间的切点；另外缅甸种群 RGN3、RGN 206 与 TAW 3146.1 相比，变异相对较大，但基本上是多一个或少一个切点的变异，而且只发生在这个缅甸种群中。

表 3 各单雌系的 mtDNA 限制性类型

Tab.3 Restriction patterns of mtDNA in the isofemal lines

	Bcl Ⅰ	*Eco*R Ⅰ	*Eco*R Ⅴ	*Hin*d Ⅲ	*Pvu* Ⅱ	*Sac* Ⅰ	*Sca* Ⅰ	*Xba* Ⅰ
TAW 3146.1	A	A	A	A	A	A	A	A
DHS*, NKS 9212, 9231	A	A	A	A	A	A	A	A
NKS 9243, DHS 307, 315	A	A	A	B	A	A	A	A
MMY 307, 326	A	B	A	A	A	A	A	A
RGN 3	B	A	A	A	A	A	B	A
RGN 206	B	A	A	A	A	B	A	A

注：* DHS 207、211、215、216、217、221、305、311、400、401、410、501。

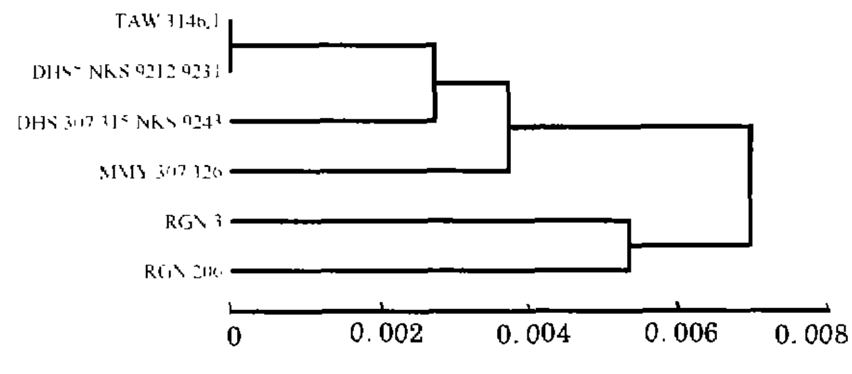


图 2　各单雌系的遗传距离示意图

Fig.2　The mtDNA dendrograms of isofemale lines

各单雌系的遗传距离见表 4。相对而言，它们之间的遗传距离（*P*）是非常接近的（0.00274—0.00868）。

对各单雌系 mtDNA 限制性类型用 UPGMA（Sneath 等，1973）进行聚类分析，结果见图 2。很明显，TAW 3146.1 和 DHS*，NKS 9212、9231 是一样的，它们与 NKS 9243 的关系非常近，然后才与 MMY 307、326 聚类，而 RGN 3 和 RGN 206 首先聚成一个类，然后与其它品系聚类。

表 4　各单雌系的遗传距离（%）

Tab.4　Genetic distance among five isofemale lines of *D. lini*　(%)

	TAW 3146 1	DHS* NKS 9212 NKS 9231	DHS 307 DHS 315 NKS 9243	MMY 307 MMY326	RGN 3	RGN 206
TAW 3146 1		1.000	0.952	0.952	0.909	0 906
DHS* NKS 9212, 9231	0 000		0 952	0.952	0.909	0.906
DHS 307, 315 NKS 9243	0 274	0 274		0.903	0.862	0.857
MMY 307, 326	0.274	0.274	0 572		0 862	0.857
RGN 3	0 534	0 534	0 835	0.835		0.909
RGN 206	0.553	0.553	0.868	0.868	0 534	

注：对角线以上为限制性片段共享度（*F*），对角线以下为遗传距离（*P*）。

* DHS 207、211、215、216、217、221、305、311、400、401、410、501。

3　讨论

根据遗传距离聚类分析的结果，所测试的林氏果蝇各种群可以分为 3 组：1）台湾种群及大部分广东鼎湖山种群、南昆山种群 NKS 9212 9231，广东鼎湖山种群 DHS 307、315 及南昆山 NKS 9243 仅在 *Hind*Ⅲ的酶切位点上与上述各单雌系有所不同，但说明这两个种群已开始分化，遗传距离仅为 0.00274；2）缅甸 MMY 307 326 也只在 *Eco*RⅠ的酶切点与台湾种群有所区别，与它的遗传距离为 0.00274，但与 DHS 307 315 NKS 9243 的遗传距离却加大了；3）缅甸 RGN 两个单雌系已经分化，它们与所有被测试的种群都有不同的遗传距离、与台湾种群距离小于缅甸两种群间的距离。这一结果与生殖隔离测试

的结果（Oguma 等，1995）是一致的。据此及生殖隔离的结果，我们认为林氏果蝇各种群间有所分化，即使缅甸种群还没有分化为不同的两个种。

缅甸 MMY 307 和 MMY 326 与 TAW 3146.1 之间的遗传距离为 0.00274，小于 Kim 等（1993）的结果，这可能是所选择的限制性内切酶不同所致。而缅甸 RGN 3 和 RGN 206 与 TAW 3146.1 的遗传距离则较大，分别为 0.00534 和 0.00553。但缅甸两种群 RGN 3，206 与 MMY 307，326 的遗传距离是各组间最大的，分别为 0.00835 和 0.00868。根据 mtDNA 的限制性类型，来自不同地区的品系均具有其独有的类型。但相对而言，缅甸中部和南部品系的类型，或许它们来源于不同的地区。假定林氏果蝇起源于中国华南地区，但向不同的方向发生分化。由于林氏果蝇在我国云南也有分布，我们尚不了解该种群的 mtDAN 酶切类型，加之本次实验所用的单雌系由于取材困难有一定的局限，真正了解该种的起源地与扩散路线，有待进一步研究。

由于 TAW 3146.1 和广东省大部分品系与缅甸中部及南部品系的遗传距离较小（$P=0.00274$—0.00553），远小于 *D. melanogaster* 种组中的种间遗传距离（$P=0.049$—0.088）（Solignac 等，1986），也小于 *D. kikkawai* 复合种组的种间遗传距离（$P=0.0277$—0.0598）（Kim 等，1993）。因此其亲缘关系是非常密切的。推算台湾省和广东省品系与缅甸品系之间的分化大约在距今 28 至 14 万年之间，而缅甸中部和缅甸南部的品系则向不同的方向分化。虽然据生殖隔离测试的结果，它们之间存在不同程度的生殖隔离。但未达到完全隔离的程度。所以，我们认为林氏果蝇不同地理种群的差异可能只是种内分化。

致谢 本研究得到日本东京都立大学分子遗传学研究室 O. Kitagawa 教授，T. Aotsuka 博士，日本北海道大学低温科学研究所 M. J. Toda 教授的指导和帮助，特此致谢。

参 考 文 献

王 文，凌发瑶，施立明．1993．银额果蝇自然群体中的 mtDNA 多态性研究 I．银额果蝇自然群体内存要丰富的 mtDNA 多态性．中国科学（B 辑），23(11)：1158—1168.

王 文，凌发瑶，施立明，1994．银额果蝇自然群体中的 mtDNA 多态性研究 II 银额果蝇的起源和分化，遗传学报，21(4)：263—274.

陈伟京，张建之，庚镇城等，1994．上海及邻近地区果蝇（*Drosophila albomicans*）的迁入及其线粒体 DNA 多态性研究，遗传学报，21(3)：179—187

贾振宇，朱定良，庚镇城等．1995．中国大陆若干群体的黑果蝇的线粒体 DNA 多态性研究，动物学研究，16(1)：65—73.

Bock I R, Wheeler M R, 1972. The *Drosophila melanogaster* species group. Univ. Texas Publ. 7213, 1-102.

Brown W M, 1985. The mitochondrial genome of animals. In: melecular evolutionary genetics. New York: Plenum Press. 95-130.

Cann R L, Stoneking M, Wilson A C, 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, **325**：31-36.

Chang H Y, Chang S H, Chu M L *et al*, 1988. Mitochondrial DNA polymorphism in *Drosophila albomicans* in Taiwan. *Bull. Inst. Zool*, **27**(1)：27-35.

Chang H Y, Wang D, Ayala F J, 1989a. Mitochondrial DNA evolution in the *Drosophila nasuta* subgroup of species. *J. Molec. Evol.*,**28**：337-348.

Chang H Y, Ayala F J, 1989b. On the origin of incipient reproductive isolation: the case of *Drosophila alblmicans* and *D. nasuta*. *Evolution*, **43**(8)：1610-1624.

Clary D O Wolstenholme D R, 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*:Nucleotide sequence, gene organization, and Genetic code. *J. Mol. Evol.*, **22**：252-271.

Coen E S, Thoday J M, Dover G, 1982 Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster* Nature, **195**: 564–568.

Kim B K, Watanbe T K, Kitagawa O, 1989. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* subgroup. I. Reproductive isolations and the phylogeny. *Jpn. J. Genet.*, **64** : 177–190.

Kim B K, Aotsuka T, Kitagawa O, 1993. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* subgroup. Ⅱ. Mitochondrial DNA variation *Zool. Sci.*, **10** : 991–996.

Nei M, Li W H, 1979 Mathematical model for studying genetic vanstion in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** : 5269–5273.

Oguma Y, Wen S Y, Tomaru M *et al*, 1995. Reproductive isolation between *Drosophila lini* and its siblings *Jpn J. Genet.*, **70** : 311–320.

Ohnishi S, Kawanishi M, Watanbe T K, 1983. Biochemcal phylogenies of *Drosophila*: protein differences detected by two-dimensional electrophoresis *Genetica*, **16** 55–63.

Ohnishi S, Watanabe T K. 1984 Systematics of the *Drosophila montium* species subgroup: a biochemical approach. *Zool. Sci.*, 1 801–807.

Shah D M, Langley C H, 1979. Inter– and antraspecific variation in restriction map of *Drosophila* mitochondrial DNAs *Nature*, **281**: 696–699.

Sneath P H A, Sokal R R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman.

Solignac M, Monnerot M, Mounolou J C. 1986. Mitochonodrial DNA evolution in *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, **23** . 31–40.

Tamura K, Aotsuka T, 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochemical Genetics*, **26** : 815–819.

Tsacas L, Dacid J, 1977. Systematics and biogeography of the *Drosophila kikkawai* complex, with descriptions of new specise (Diptera, Drosophilidae). *Annls Soc. ent. Fr.* (N. S.), **13** · 675–693.

STUDIES ON MITOCHONDRIAL DNA COMPARISONS OF *Drosophila lini* WITHIN DIFFERENT POPULATIONS

Xie Li　Wen Shuoyang　Xie Yiquan　Peng Tongxu

(*Guangdong Entomological Institute, Guangzhou* 510260)

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) variation was investigated among 22 isofemale lines from different populations of *Drosophila lini* with 10 restriction endonucleases. The isofemale lines were collected originally from Taiwan, Guangdong in China and Yangon (Rangoon), Pyinoolwin (Maymyo) in Myanmar. Comparison of the cleavage sites allowed us to build a phylogenetic tree based on genetic distances of isofemale strains. The results show as follows: 1) The mtDNA nucleomorph is the same in isofemale lines from Taiwan (TAW 3146.1) and Guangdong except DHS 307, 315 and NKS 9243 from Guangdong. 2) The difference is not found between MMY 307 and 326. 3) The strains from Myanmar might have diverged. The genetic distance between TAW 3146.1 and RGN 3, RGN 206 is 0.00534 and 0.00553, between MMY 307, 326 and RGN 3, RGN 206 is 0.00835 and 0.00868. 4) The genetic distances between MMY 307, 326 and TAW 3146.1 is very close (0.00274). As the same as between DHS 307, 315, NKS 9243 and TAW 3146.1

Key words *Drosophila lini*, Mitochondrial DNA (mtDNA), Polymorphism, Genetic differentiation